Aus dem Sonderforschungsbereich
"Biologie der Mundhöhle"
(Vorstand: Prof. Dr. G. Siebert)
an der Universitätsklinik
für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
(Direktor: Prof. Dr. R. Naujoks)

KRYOCHIRURGISCHER DEVITALISIERUNGSVERSUCH AN DER HUNDEMANDIBULA

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gernot Scherer
aus Würzburg

Würzburg, den 30. Juni 1982

Aus dem Sonderforschungsbereich
"Biologie der Mundhöhle"
(Vorstand: Prof. Dr. G. Siebert)
an der Universitätsklinik
für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
(Direktor: Prof. Dr. R. Naujoks)

KRYOCHIRURGISCHER DEVITALISIERUNGSVERSUCH AN DER HUNDEMANDIBULA

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gernot Scherer
aus Würzburg

Würzburg, den 30. Juni 1982

Referent:	Prof. Dr. G. Schargus
Korreferent:	Prof. Dr. R. Naujoks
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 7. 1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	2
II.	Geschichte der Kryochirurgie	4
III.	Der Beaglehund	6
IV.	Das Prinzip der Kryochirurgie	7
V.	Kryotherapie der Hundemandibula	11
1.0	Methodik	11
1.1	Das Kühlsystem	11
1.2	Meßanordnung	13
1.3	Operatives Vorgehen	14
2.0	Ergebnisse	18
2.1	Devitalisierungsbeweis	18
2.2	Röntgenbefunde	20
2.3	Histologische Befunde	23
VI.	Diskussion	32
VII.	Zusammenfassung	35
VIII.	Literaturverzeichnis	36

I. EINLEITUNG

In den letzten Jahren wurde der Einsatz der Kryotherapie zur Tumorbekämpfung wieder häufiger diskutiert. Ihr Wert als Palliativmaßnahme war seit langem bekannt und ihre schmerzlose Applikation geschätzt. Ihr Erfolg als Tumortherapeutikum war jedoch zu unsicher. Nur bei oberflächlichen, gut sichtbaren Geschwülsten wurde das Behandlungsziel, die Zerstörung durch Nekrose, erreicht. In den meisten Fällen hätte ein chirurgischer Eingriff das gleiche Resultat erbracht und die Heilungszeit verkürzt.
Nur zur Bekämpfung von Pränkanzerosen der Mundschleimhaut ist ihr ein festes Therapiegebiet erwachsen, da durch eine Nekrose mit nachfolgender Restitutio ad integrum funktionelle Störungen durch den alternativen operativen Schleimhautverlust vermieden werden können.

Ein weiterer Anwendungsbereich hat sich durch die grundlegenden Arbeiten von GAGE und EMMINGS eröffnet, die erstmals Knochen in situ durch Kälte abtöten konnten. Die anorganische Substanz blieb als Matrix nach Devitalisierung der organischen Knochenanteile erhalten, wenn die Kälte den ganzen ossären Durchmesser gleichmäßig gekühlt hatte. Der Knochen wurde innerhalb eines dreiviertel Jahres vollkommen revitalisiert und blieb somit funktionell einsatzfähig.

Auf dem kieferchirurgischen Sektor wird durch Erhaltung der Knochenkontinuität ein zweiter Eingriff vermieden und der weitere funktionelle Einsatz des Knochens gewährleistet. Da weder radio- noch chemotherapeutische Maßnahmen eine sichere Devitalisierung des Knochens nach sich ziehen, stößt hier die Kryobehandlung in eine Therapielücke. Nach dem Beweis der sicheren Devitalisierung durch GAGE und EMMINGS hat SCHARGUS eine Methode angegeben, die klinisch ohne Weichteilläsion einsetzbar ist und den Knochen sicher

abtötet. Da bei Weichteiltumoren, die auf den Knochen übergreifen, diese in toto samt Periost entfernt werden müssen, stellte sich die Frage, ob die Knochenregeneration hierdurch beeinträchtigt wird oder eventuell gar nicht stattfindet.

Ziel der Arbeit war es, am deperiostierten Kiefer die knöchernen Revitalisationsvorgänge nach der Kryotherapie zu untersuchen.

II. GESCHICHTE DER KRYOCHIRURGIE

Daß Zellen durch Kälteeinwirkung abgetötet werden, beobachtete erstmals BOYLE 1683. ARNOTT (1840) war aber der erste, der die Kälte zur Tumorbehandlung benutzte (WILD). Er konnte mit eisgekühlter Salzlösung, die er durch einen Gummibeutel laufen ließ, das Tumorwachstum hemmen. BENNET: "Durch Applikation von Kälte wird das Wachstum der Krebszelle offensichtlich gehemmt. Wenn es möglich wäre, die Temperaturen der Krebszelle unter ihren Vegetationspunkt zu senken, müßte sie unweigerlich getötet werden." OPENCHOWSKI (1883) versuchte diese Temperatur mit Ätherdämpfen zu erreichen, schaffte es aber nicht, da die erreichten Temperaturen nur bei $-15^{\circ}C$ bis $-20^{\circ}C$ lagen. Erst 1877, als es CAILLETET gelang, Luft zu verflüssigen, konnte BENNETs Theorie Anwendung finden. Verflüssigte Gase wurden erstmals in der Dermatologie verwendet. WHITE betupfte 1899 benigne und maligne Tumoren mit flüssiger Luft. Auf diesem Gebiet wurden Karzinome, pigmentierte Naevi, Epitheliome oder Basaliome durch flüssige Luft oder flüssigen Sauerstoff erfolgreich behandelt. FAY erzielte 1936 durch Behandlung mit Eiswasser über einige Monate Schmerzfreiheit bei einem Cervixkarzinom. 1959 erreichte ROWBOTHAM mittels einer Kühlsonde, in der Alkohol zirkulierte, eine Temperatur von $-20^{\circ}C$. Eine andere Kältesonde, die heute noch, wenn auch geändert, Verwendung findet, wurde 1961 von COPPER und LEE entwickelt. Flüssiger Stickstoff kühlte sie bis auf $-196^{\circ}C$ ab. Später wurden mit ähnlichen Sonden in der Ophthalmologie, Urologie und Gynäkologie Erfolge erzielt. In der Tumorbehandlung wurde zuerst nur bei Hautneoplasmen eine Heilung beobachtet (KEE, ZACARIAN).

GAGE et al. erreichte 1965 die Devitalisierung von Teilen eines Hundefemurs und EMMINGS et al. von einem Hundeunterkieferab-

schnitt indem sie den Kiefer mit einem Silikonschlauch umwickelten und hierdurch flüssigen Stickstoff schichten.
HAUSAMEN untersuchte 1973 die Heilung der Kältenekrose am Kaninchenunterkiefer. LENZ und PREUSSLER bewiesen 1975, daß flüssiger Stickstoff das Knochenwachstum hemmt, indem sie Tibia-Femur-Gelenke von jungen Kaninchen in flüssigen Stickstoff tauchten. Bei älteren Kaninchen beobachteten sie nach einem Jahr eine vollständige Revitalisierung.
WALLISER entwickelte 1972 eine Silikonkammer, mit der er die Kaninchentibia kühlte. Er wies besonders auf die technischen Schwierigkeiten der Kälteapplikation hin und betonte die Notwendigkeit einer ausreichenden Weichteilisolation.

SCHARGUS schlug 1977 ein nicht nur an Röhrenknochen applizierbares Kühlsystem vor, das aus einer variablen Kühlschlangenkammer besteht, die sich in zahlreichen Tierversuchen bewährt hat.

Das Problem der Isolation, das bislang die meisten Probleme aufwarf, wurde durch das Anlegen eines Heizfolienelementes gelöst.

III. DER BEAGLEHUND

Die Wahl des Tieres in einer Versuchsreihe ist für das Gelingen der Experimente von entscheidender Bedeutung. Wir benutzten den Beaglehund weil er problemlos im Umgang ist und weil eine postoperative Ernährung mit weicher Kost eine gute Heilung der Operationswunde ermöglicht. Das war in Vorversuchen bei Schweinen nicht der Fall, weil das kräftige Kauen und Zermahlen auf dem Kiefer zu Schleimhautperforationen und daraus resultierenden Knochennekrosen führte. Beim Beagle dagegen wird die Nahrung verschlungen.

Warum der Beagel der erfolgreichste Hund bei Forschungen auf allen Gebieten der Wissenschaft ist, beschreibt ALLEN C. ANDERSEN in seinem 1970 erschienenen Buch: "THE BEAGLE as an EXPERIMENTAL DOG." Seine Vorteile: "mittlere Größe, relativ kurze Haarlänge, ruhiges Temperament, Anpassungsfähigkeit. Seine hervorragende Disposition und sein fröhliches Wesen sind zwei seiner größten Vorzüge, die den Umgang mit ihm sehr erleichtern. Geringe Aggressivität, Schüchternheit und Scheuheit sind für den Beagle charakteristisch."

Abb. 1: Der Beaglehund

IV. DAS PRINZIP DER KRYOCHIRURGIE

Die letale Wirkung der Kälte auf Zellen beruht auf der Bildung von Eiskristallen (MAZUR, COOPER, LOVELOCK, MERYMAN). Entscheidend dabei ist deren Größe und Lage. Das Verhalten der Zelle wird von folgenden Faktoren bestimmt:

1. Modus der Applikation und Angriffsfläche
2. Erreichte Tiefsttemperatur
3. Geschwindigkeit des Temperaturabfalls
4. Geschwindigkeit des Auftauens
5. Dauer und Häufigkeit der Kälteeinwirkung

Zu 1.: Die Kälte kann direkt oder indirekt auf die Zelle wirken. Bei der ersten Methode erfolgt ein direkter Kontakt zwischen dem Gewebe und dem Kühlmittel, z.B.: Kältespray oder Betupfen mit in Kühlmittel getränkten Wattekügelchen. SIGEL und SCHROTT entwickelten ein Kältesystem, bei dem flüssiger Stickstoff mittels einer Spritzdüse auf das zu behandelnde Gewebe gebracht wird. Eine direkte Applikation kann auch durch Eintauchen des betreffenden Körperteils in die LN_2-Lösung erreicht werden.
Bei der indirekten Methode erfolgt die Kühlung durch einen Kälteträger. Das einfachste Verfahren ist das Berühren mit einem gut wärmeleitenden Metallstab, den man vorher in einem Kühlmittel abkühlt (CLAUSEN und SCHMITT). Die Wirkungsdauer ist aber sehr kurz, da sich der Stab mit der Zeit aufwärmt. Mit einer Kryosonde kann man zeitlich unbegrenzt kühlen. Das flüssige Kühlmittel verdampft an der Sondenspitze, die die Kälte auf das Gewebe überträgt. Ein Thermoelement kontrolliert die Temperaturen und ein Heizfaden ermöglicht das Lösen von der Gefrierstelle. Eine indirekte Methode ist das Abkühlen mit einem Kammerflußsystem (ARNOTT, GAGE, EMMINGS, WALLISER, SCHARGUS). Entscheidend bei all diesen Methoden ist auch die Angriffsfläche. Bei der eindimensiona-

len Applikation, wie Kontaktsonden und einflächig aufgelegte Kühlkammern, ist die Tiefenwirkung geringer als durch die dreidimensonale Applikation, bei der die Kühlkammer zirkulär angelegt wird und alle Zellen des Gewebsdurchmessers abgetötet werden können.

Zu 2.: Mit dem Kelmann-Kryostylet erreicht man Temperaturen von -20°C bis -30°C. Hierbei benutzt man den Peltier-Effekt zur Kältegewinnung. Eine Temperatursenkung kann man z.B. auch durch den Joule-Thomson-Effekt bei N_2O mittels einer Düse in ein Vakuum, so dehnen sich die Moleküle aus, die potentielle Energie steigt, die kinetische nimmt ab und es kommt zu einer Temperatursenkung. Mit Hilfe des Joule-Thomson-Effekts kann man verflüssigte Gase herstellen, deren Siedepunkt sehr niedrig ist (O_2 - 183°C; Luft -190°C; Stickstoff -196°C; H_2 - 253°C; Helium -269°C).

Zu 3.: Man unterscheidet zwei Gefrierarten, was die Gefriergeschwindigkeit anbelangt: a) langsames Gefrieren
b) schnelles Gefrieren

a) Langsames Gefrieren bedeutet einen Temperaturabfall von bis 10°C pro Minute (MAZUR). Bis zu dieser Temperatur werden extra- und intrazelluläres Wasser gleichmäßig abgekühlt. Bei 10°C bilden sich extrazelluläre Eiskristalle (Durchmesser ca. 50 Å). Das intrazelluläre Wasser kann dagegen bis -20°C gekühlt werden. Durch die relativ großen Eiskristalle im extrazellulären Raum kommt es zur Dampfdruckerhöhung in der Zelle (MERYMAN). Um das osmotische Gleichgewicht zu erzielen, strömt freies Wasser aus der Zelle. Es wird der Zelle so viel Wasser entzogen, bis das Protoplasma durch eine überhöhte Elektrolytenkonzentration zerstört wird (LOVELOCK).
Sind die osmotische Druckdifferenz sehr hoch, entstehen zusätzlich irreversible Membranschäden (MERYMAN).

b) Erfolgt der Temperatursturz mit mehr als 10^{o}C pro Minute, spricht man von einem schnellen Gefrieren. Die Zeitdifferenz zwischen extra- und intrazellulärer Eisbildung ist sehr gering. Dieses fast gleichzeitige Gefrieren bei einem Temperaturgefälle von über 10^{o}C/min nennt man homogene Nukleation. Bei einer Geschwindigkeit von 100^{o}C/min ist alles intrazelluläre Wasser vereist (MAZUR 1966).
Sowohl eine schnelle, wie auch eine langsame Abkühlung können eine optimale Kühlung bewirken. Bis $0,05^{o}$C/min findet eine Zellschädigung statt, zwischen 1^{o}C - 10^{o}C/min nimmt sie ab, zwischen 500 - 1000^{o}C nimmt sie wieder zu. Über 1000^{o}C/min nimmt sie wieder ab (MAZUR). Die sicherste und einfachste Devitalisierung wird durch die homogene Nukleation erreicht (Mindesttemp. -20^{o}C, Geschwindigkeit mindestens 100^{o}C/min.)

Zu 4.: Analog zur Gefriergeschwindigkeit ist auch die Auftaugeschwindigkeit für das Gelingen eines Gefriervorganges von Bedeutung. Auch hier unterscheidet man ein langsames und ein schnelles Auftauen. Beim langsamen Auftauen rekristallisieren die durch homogene Nukleation entstandenen Eiskristalle zu großen sphärischen Körpern, die die intrazelluläre Zellmembran und die Organelle zerstören und zum Zelltod führen. Dieser Vorgang tritt besonders in einem Temperaturbereich von -50^{o}C auf.
Erfolgt das Auftauen schnell, vor allem bei Erwärmungsgeschwindigkeiten von 1000^{o}C/min, so wandeln sich die kleinen Eiskristalle direkt in andere Kristallformen um. Die Rekristallisation wird somit umgangen und eine Zellschädigung bleibt aus.
Voraussetzung für einen Zelltod, der auf der Auftaugeschwindigkeit beruht, ist die homogene Nukleation, da nur bei ihr intrazelluläre Eiskristalle entstehen.

Zu 5.: Wiederholtes Einfrieren verstärkt den Effekt der Kryochirurgie. Noch überlebende Zellen werden abgetötet und man erreicht eine größere Gefriertiefe (GAGE et al). Zwischen den beiden Gefriervorgängen muß das Gewebe wieder auftauen. Ein zweites Einfrieren gefrorener Zellen vermindert die Überlebensrate nicht weiter. Unter Umständen könnte es dabei zu einer Konservierung der noch lebensfähigen Zellen kommen ("Zwei-Stufen-Effekt").

Am einfachsten und am sichersten ist eine Zelldevitalisierung durch die homogene Nukleation zu erreichen. Die Tiefsttemperatur sollte mindestens $-20^{\circ}C$ (MAZUR, COOPER) und die Gefriergeschwindigkeit ca. $100^{\circ}C$/min betragen. Beim Auftauen sollten $10^{\circ}C$ /min betragen. Beim Auftauen sollten $10^{\circ}C$ /min nicht überschritten werden (HAUSAMEN).

V. KRYOTHERAPIE DER HUNDEMANDIBULA

1.0 METHODIK

1.1 DAS KÜHLSYSTEM

SCHARGUS et al. wies 1968 auf die Insuffizienz der von GAGE und EMMINGS 1966 angegebenen Schaumgummiisolierung hin. Der Schaumgummi saugte sich voll Blut und Gewebsflüssigkeit und verlor somit seine Isolationseigenschaft. Ein zweiter, entscheidender Nachteil von EMMINGS Kälteapplikator ist das Abknicken der Silikonschläuche bei kleinen Krümmungsradien, das zu einem Stau im Kälteflußsystem führt und somit den Kühlvorgang beendet. Um Knochen beliebiger Konfiguration kühlen zu können, stellte SCHARGUS 1977 eine klinisch leicht einsetzbare Kühlschlangenkammer vor, die aus parallel verlaufenden Silikonschläuchen (Innendurchmesser 5 mm) besteht, die durch U-förmige Messingröhrchen in Reihe verbunden sind. Man verwendet so viele gleich lange Silikonschläuche bis der zu devitalisierende Knochenabschnitt damit bedeckt ist (Abb. 2).

Abb. 2: Die Kühlschlangenkammer vor dem Kältedurchfluß

Der Knochen wird von zwei Seiten von den Kühlschlangen bedeckt und ein Abknicken der Schläuche, wie bei der Umwicklung des Knochens, tritt nicht ein. Die beiden Teile werden von einer Armaflexmanschette, die an ihren Enden mit einem Klettenband versehen ist, eng an den Knochen gedrückt.
Um ein Gefrieren der Weichteile in der Umgebung der Kühlkammer zu vermeiden, verwendeten wir ein Folienheizelement, das zwischen der Kühlkammer und den Weichteilen plaziert wurde (Abb. 3).

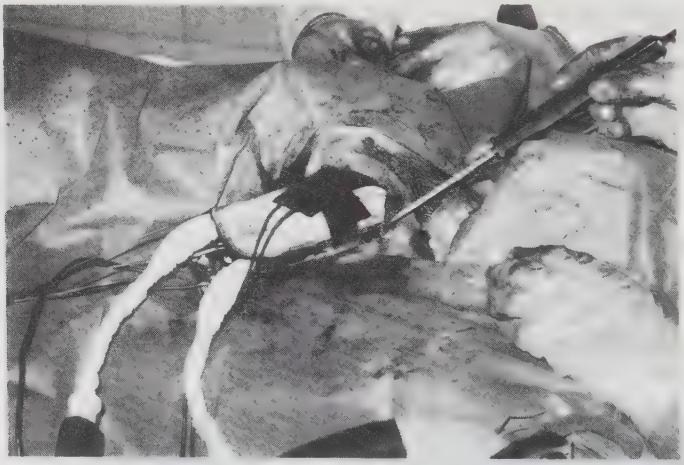

Abb. 3: Die Kühlschlangenkammer während des Kühlvorganges

Als Kältemittel verwendeten wir flüssigen Stickstoff, dessen Siedepunkt bei -196°C liegt. Es ist ein ideales Kühlmittel, preiswert und muß nicht in Druckgefäßen aufbewahrt werden. Der flüssige Stickstoff wurde in dem Dewar-Gefäß "Cryotherm" der Firma Siegtal aufbewahrt. Mittels Preßluft (optimaler Arbeitsdruck 0,2 at) wurde der flüssige Stickstoff über ein Steigrohr in das Kühlsystem gebracht. Der Druck kann an einem eingebauten Manometer abgelesen werden.

1.2 MESSANORDNUNG

Um die Temperaturvorgänge im Knochen aufzeichnen zu können, verwendeten wir drei geeichte Chromel-/Alumel Thermofühler, die an der Margo inferior des Unterkiefers in drei Vorbohrungen eingebracht wurden (Abb. 4).

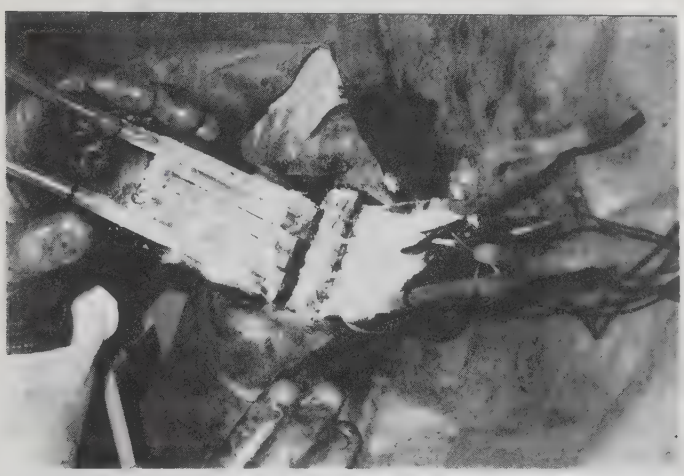

Abb. 4: Die drei farblich markierten Thermofühler

Der Chromel-Alumel-Durchmesser der Thermoelemente beträgt 1 mm. Chromel und Alumel, zwei Speziallegierungen werden durch Magnesiumoxyd gegenseitig elektrisch isoliert. Die gemessenen Temperaturen werden von einem Dreikanalflachschreiber der Fa. LINSEIS übertragen. Die Tiefsttemperatur von -196°C wurde durch Eintauchen eines Thermofühlers in flüssigen Stickstoff auf dem Papier des Schreibers markiert Einer bestimmten Temperaturdifferenz entspricht eine bestimmte Thermospannung, die einen Ausschlag des Schreibers bewirkt. Um Verwechslungen auszuschließen, wurden die Sonden und die Kanäle den Schreiberfarben entsprechend markiert.

1.3 OPERATIVES VORGEHEN

Um eine gleichmäßige Devitalisierung zu erzielen, wurden den acht zu untersuchenden Hunden die Zähne P_1, P_2, P_3, P_4, M_1 und M_2 in Intubationsnarkose extrahiert (Abb. 5).

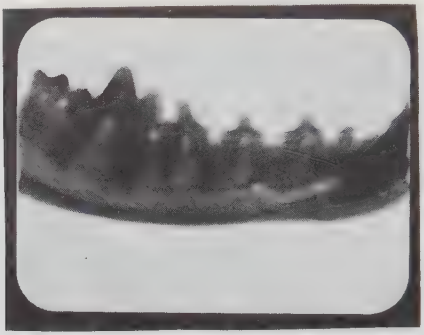

Abb. 5: Röntgenbild eines Beagle UK's mit den zu extrahierenden Zähnen

Nach Abheilung der Extraktionswunden konnte die Freilegung der Mandibula erfolgen.

Der kryochirurgische Eingriff erfolgte in Intubationsnarkose unter aseptischen Kautelen.
Ein intraoraler Schnitt auf dem Alveolarkamm erwies sich als unzweckmäßig, da es zu postoperativen Komplikationen kam. Selbst eine Verblockung des UK's mit dem OK durch einen Palavit-Block und eine anschließende Magensondenernährung, die sich später als unphysiologisch erwies, konnten den Zustand nicht verbessern.
Die Tiere wühlten instinktiv in ihren eigenen Fäkalien, da ihr Ernährungstrieb durch die Flüssigkoste nicht befriedigt wurde.

Um Komplikationen zu umgehen, legten wir die Mandibula deshalb von extraoral frei, ohne die Mundhöhle zu eröffnen. Nach Rasur der Haare und Desinfektion der Haut wurde durch einen submandibulären Schnitt, der vom Kieferwinkel bis zum Eckzahn reichte, Fettgewebe und Platysma durchtrennt. Die Schleimhaut und das Periost wurden vestibulär und lingual soweit abgelöst, bis genügend Platz für das zirkuläre Einbringen der Kühlkammer geschaffen wurde (Abb. 6).

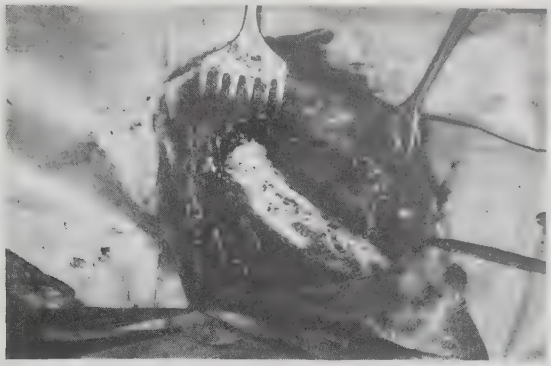

Abb. 6: Unterkiefersegment zur Aufnahme des Kälteapplikators freipräpariert

Zur Aufnahme der drei geeichten Chromel-Alumel Thermofühler bohrten wir an der margo inferior des Unterkiefers drei Löcher. Nach deren Einführung in die Bohrlöcher wurde die Kühlkammer mit dem Klettverschluß adaptiert und die Thermoheizelemente eingeschaltet, um ein Gefrieren der Weichteile zu vermeiden. Zusätzlich wurden zur seitlichen Isolation Gazetupfer eingebracht. Während des gesamten Gefriervorganges wurde die Temperatur der Weichteile durch eine Heizstromregulation über $10^{o}C$ gehalten.
Die Schläuche der Kühlkammer verbanden wir mit dem Dewargefäß und gaben so viel Preßluft, bis ein konstanter Druck von 0,2 kp/cm^2 erreicht war und der flüssige Stickstoff kontinuierlich durch die Kühlkammer strömte. Nach 20 Minuten wurde eine Tiefsttemperatur

von -193°C erreicht und 8 Minuten lang konstant gehalten (Abb. 7).

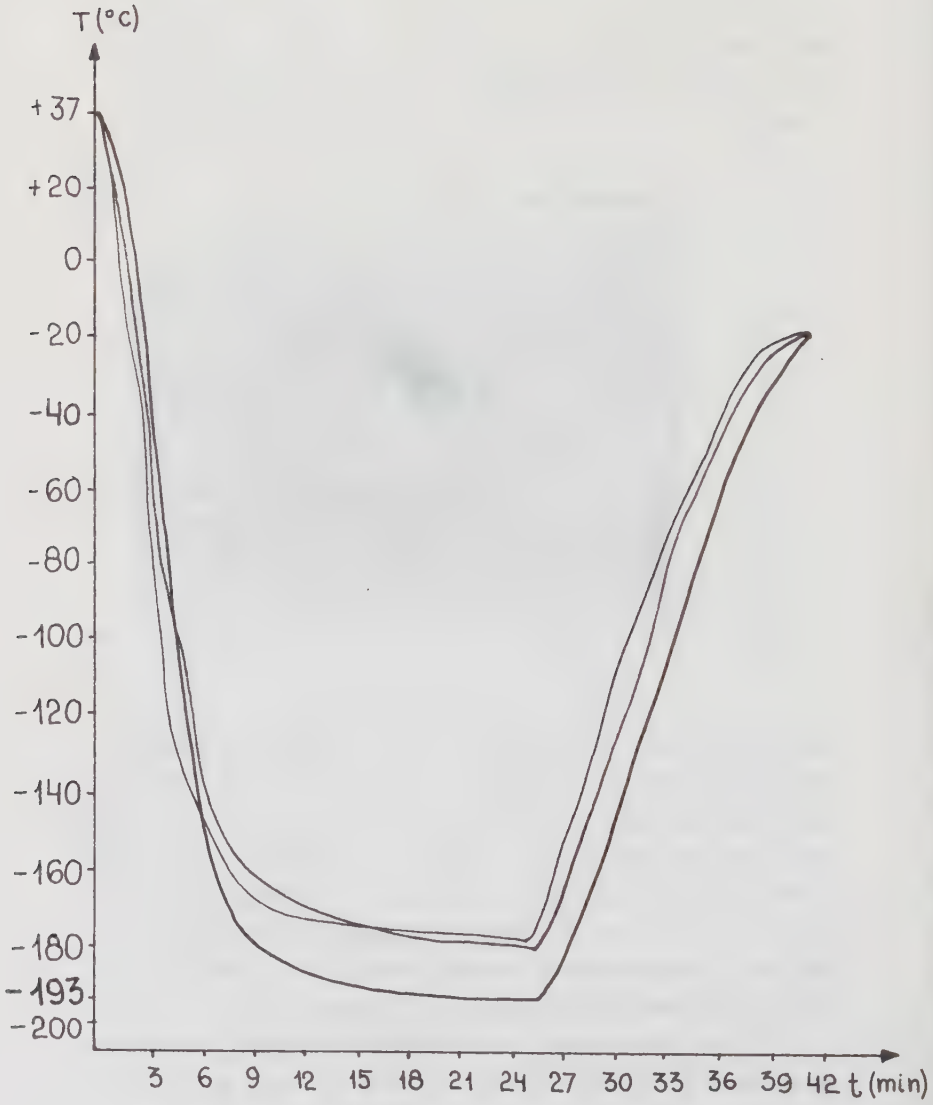

Abb. 7: Meßkurve

Um den Rekristallisationseffekt auszunutzen, wurde die Stickstoffzufuhr abgeschaltet und der Knochen langsam aufgetaut. Danach wurde die Muskulatur mit einer fortlaufenden Catgutnaht und die Haut mit Seide zusammengenäht. Die verschlossenen Wundränder besprühten wir mit Nebacitin^{R}. In den ersten Wochen erhielten die Tiere täglich 100 000 IE Megacillin^{R} i.m. nach 7 Tagen wurden die Fäden entfernt. Komplikationen blieben aus.

Ab der 4. Woche p.o. wurde den Tieren pro Monat jeweils ein Fluorochrom in der Reihenfolge: Tetracylin, Alizarin, Xylenol-Orange, Calcein und Calcein Blau, zur zeitlichen Markierung der Knochenregeneration i.m. injiziert. Bis zum 8. Monat wurde alle vier Wochen ein Tier getötet und das gekühlte Unterkiefersegment entnommen. Der Knochen wurde klinisch auf Festigkeit geprüft, danach geröntgt und nach SCHENKscher Stückfärbung in basischem Fuchsin in Methylmethacrylat eingebettet. Mit dem Sägemikrotom 1600 von LEITZ wurden Hartschnitte von 60-80 µ hergestellt und im Hellfeld und unter Fluoreszenzanregung untersucht.

2.0 ERGEBNISSE

2.1 DEVITALISIERUNGSBEWEIS

SCHARGUS erbrachte wie schon 1977 am Göttinger Minischwein und an der Kaninchentibia auch hier den Beweis einer sicheren Zelldevitalisierung. Der Unterkiefer eines weiteren Tieres wurde 8 Tage nach dem Kryoversuch entfernt, in EDTA entkalkt, mit dem Mikrotom geschnitten und mit DELAFIELDschem Hämalaun gefärbt. Nach der Entkalkung konnte die Devitalisierung histologisch eindeutig bewiesen werden. Die Osteozytenlakunen waren weit und leer (Abb. 8).

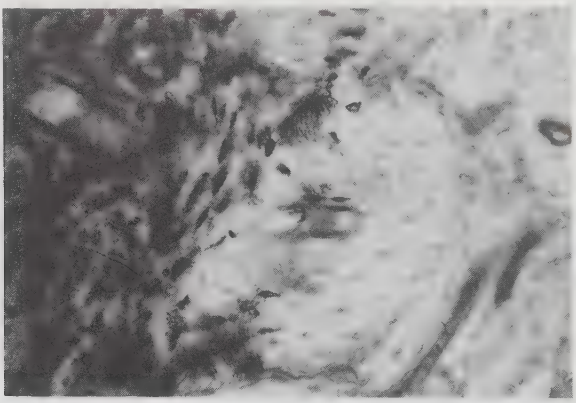

Abb. 8: Histologisches Bild mit leeren Lakunen

In den Randzonen des gekühlten Knochens konnten die Stadien des Osteozytenunterganges untersucht werden (Abb. 9).

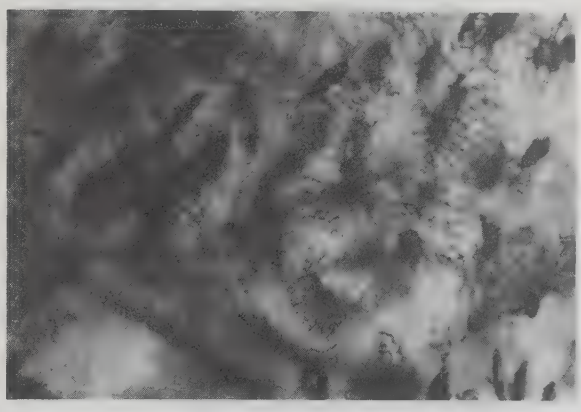

Abb. 9: Die Stadien des Osteozytenunterganges

Die Osteozytenlakune ist anfangs erweitert und der Kern vergrößert. Später liegt der Pyknotisch gewordene Kern dezentral und wird samt Zytoplasmareste an den Rand der noch größer gewordenen Lakune und schließlich in die feinsten Knochenkanälchen gedrängt.

2.2 RÖNTGENBEFUNDE

Von den entnommenen Unterkiefersegmenten wurden post mortem Kontaktröntgenaufnahmen angefertigt. Die Bilder wurden von der achten Woche bis zum achten Monat in einem Abstand von vier Wochen hergestellt. Die Analyse der Röntgenbilder ergab folgendes:

8. Woche: Die Kühlzone ist transluzenter als die Randgebiete. Eine poröse Kallusbildung ist vorhanden. An der Margo superior zeigt die Korticalis endostale und periostale Resorptionslakunen (Abb. 10).

Abb. 10

12. Woche: Status idem. Die Kallusmenge hat zugenommen (Abb. 11)

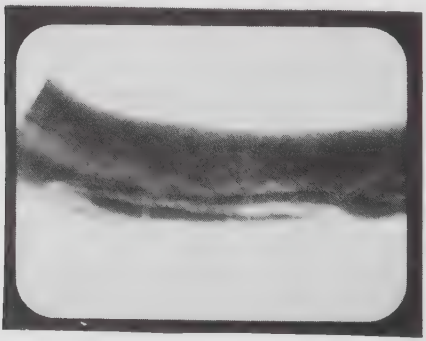

Abb. 11

16. Woche: Der Kallus ist in geringem Maß, vor allem in der Nähe des Mandibularkanals, zu sehen. Der Knochen ist opaker geworden (Abb. 12).

Abb. 12

20. Woche: Die Resorptionsphase ist beendet. Geringe Transluzenz im Bereich der Bohrlöcher (Abb. 13).

Abb. 13

24. Woche: Status idem (Abb. 14

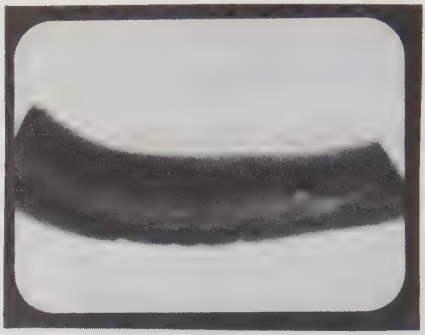

Abb. 14

28. Woche: Im Bereich der Kühlzone scheint der Knochen wie ausgestanzt zu sein und wirdum den Mandibularkanal herum transluzenter (Abb. 15)

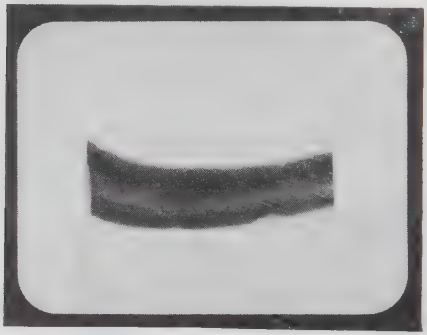

Abb. 15

32. Woche: Die Bohrlöcher sind fast gänzlich verschwunden. Die Korticalis ist verdickt und an der margo inferior begradigt (Abb. 16)

Abb. 16

2.3 HISTOLOGISCHE BEFUNDE

Nach 8 Wochen: Nach zwei Monaten beginnen Gefäße vom gesunden Knochen her in das tote Os einzusprießen, um die sich neuer Knochen bildet. In den Randzonen, vom vitalen Knochen her, ist deutlich diffuses Tetracyclin eingelagert, wobei die Masse des eingelagerten Tetracyclins in der Spongiosa bzw. im Mark liegt (Abb. 17).

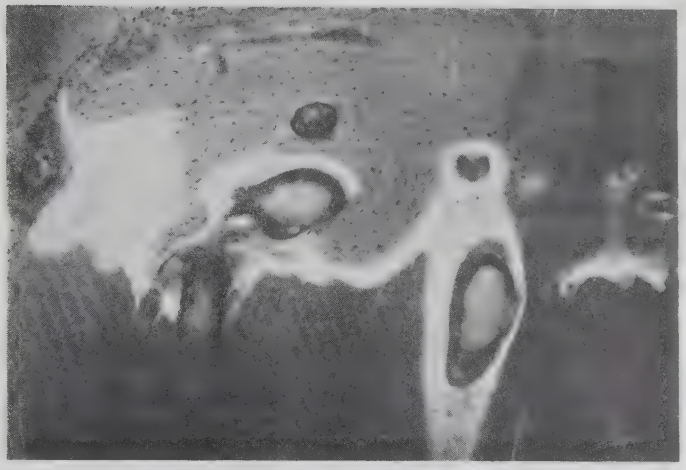

Abb. 17: Tetracyclineinlagerungen in der Randzone

Um die Gefäße herum läßt sich nur ganz vereinzelt, besonders in den Übergangszonen und hier mehr proximal eine Gelbeinlagerung erkennen, während distal fast nichts zu finden ist.

An den Stellen, wo noch Periost am Alveolarkamm erhalten ist, sieht man eine hohe Knochenbildungsrat. (Abb. 18)

Abb. 18: Subperiostale Knochenbildung

Ansonsten ist der mittlere, der gekühlte Abschnitt noch periostfrei. Erst von den Randzonen, von proximal, schiebt sich neues dickes Periost auf den toten Knochen, wo bereits mehrfarbige Knochenstrukturen (gelb und rot) entstanden sind (Abb. 19).

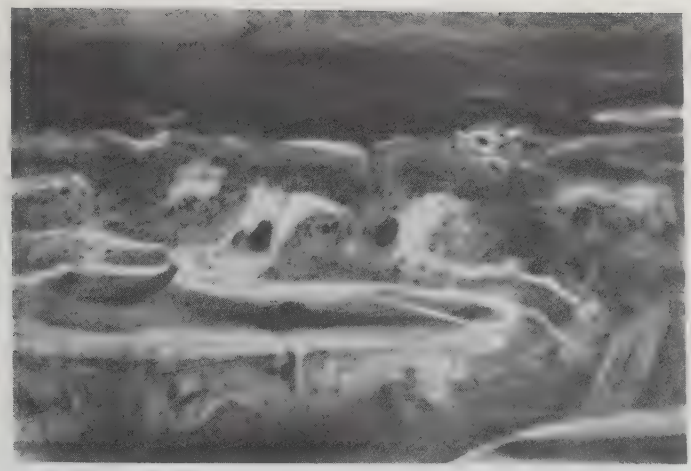

Abb. 19: Gelb- und Roteinlagerungen

Im Knocheninneren sieht man fast parallel dazu verlaufende, großlumige Gefäße um die herum sich bereits lamelläre, gelbe Streifen finden lassen (Abb. 20).

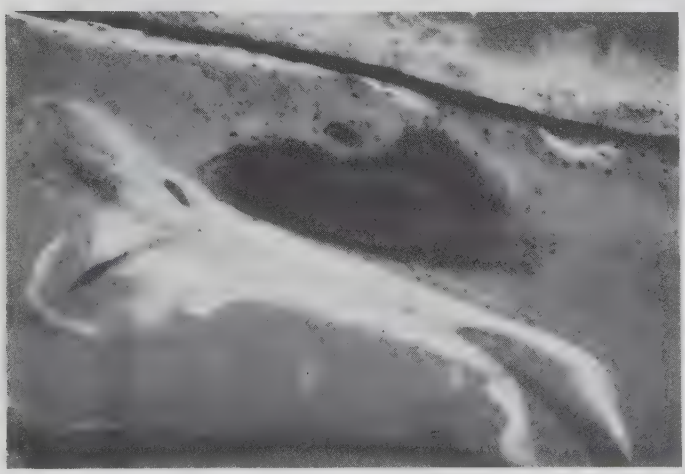

Abb. 20: Perivaskuläre Knochenregeneration

Nach 16 Wochen: Rot ist die zweite Farbe, die hier nur diffus zu sehen ist. Weiter zum Knochenmark zu findet man diffuse rote und gelbe Streifen, wobei die Rotzeichnung überwiegt, die erst nach zwei Monaten eingelagert worden ist. Weiter zur Mitte des toten Knochens hin wurde die Einlagerung des neuen Knochens in die Korticalis um die Gefäße herum geringer; hier erkennt man vor allem Grünapposition (Abb. 21).

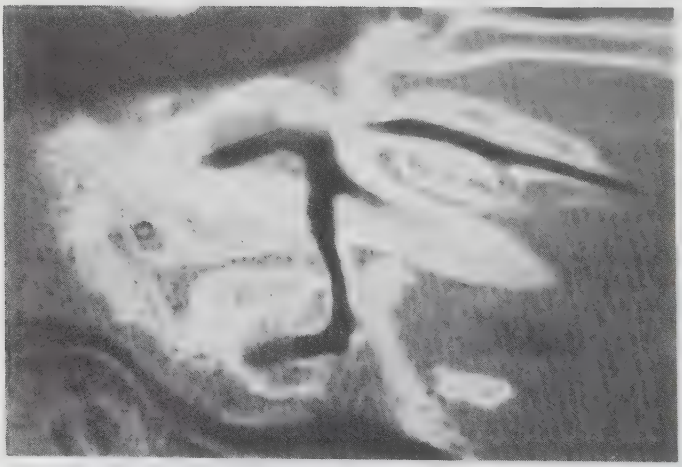

Abb. 21: Grünapposition

Bei den sonstigen Gefäßen befindliches Rot scheint es sich um Fuchsin zu handeln. Im Mark sieht man auch Orange (Abb. 22) diffus eingelagert, viel geringer als rot und gelb.

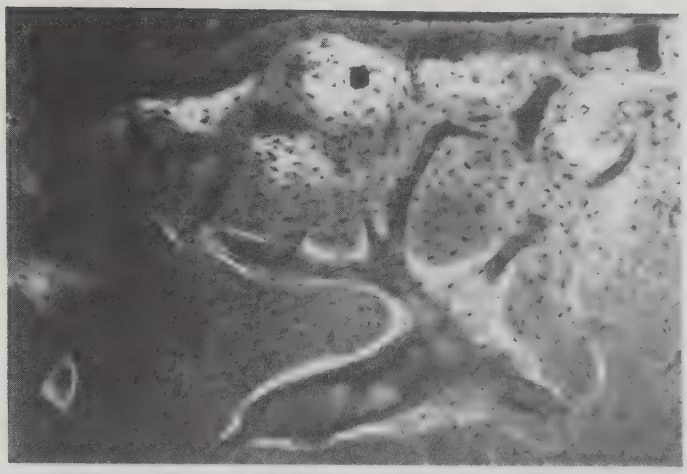

Abb. 22: Orangeeinlagerung

Auch im endostalen Bereich haben sich wesentlich stärker als in den Abschnitten, wo das Periost entfernt wurde - besonders in den 4. Monaten - neue Knochenlamellen auf den toten Knochen geschoben.

Nach 24 Wochen: Die perivaskuläre Neubildung stagniert. Die Kallusmenge hat nur im Bereich der Bohrlöcher zugenommen. Besonders subperiostal ist die Kühlzone von polychromen Bändern durchzogen (Abb. 23).

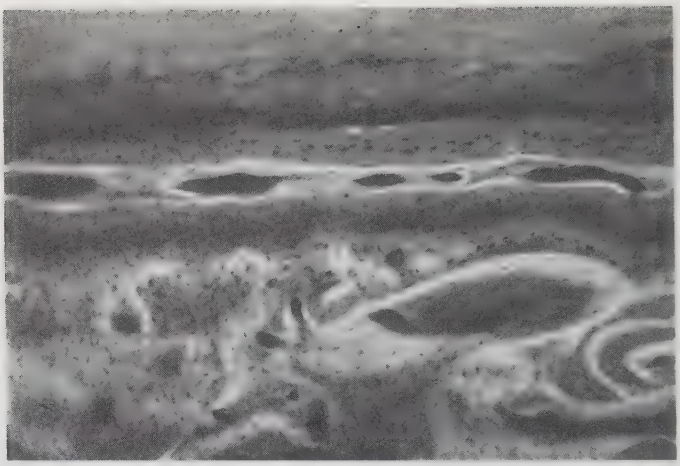

Abb. 23: Polychromer Kallus subperiostal

An der Margo superior, wo das Periost belassen wurde, ist die Knochenneubildung am stärksten ausgeprägt (Abb. 24).

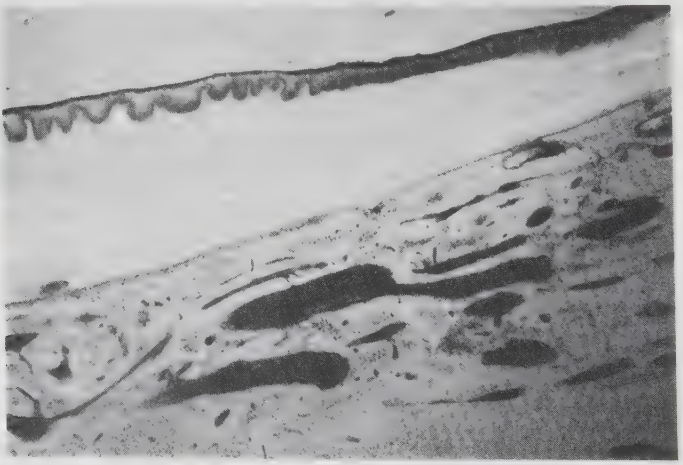

Abb. 24: Knochenneubildung an der Margo superior

Nach 32 Wochen: Subperiostal ist hier schon eine breite Knochenlamelle durch neuen Knochen ersetzt worden, wobei deutlich zu sehen ist, daß am Alveolarkamm die Regeneration vorherrscht (Abb. 25 und 26).

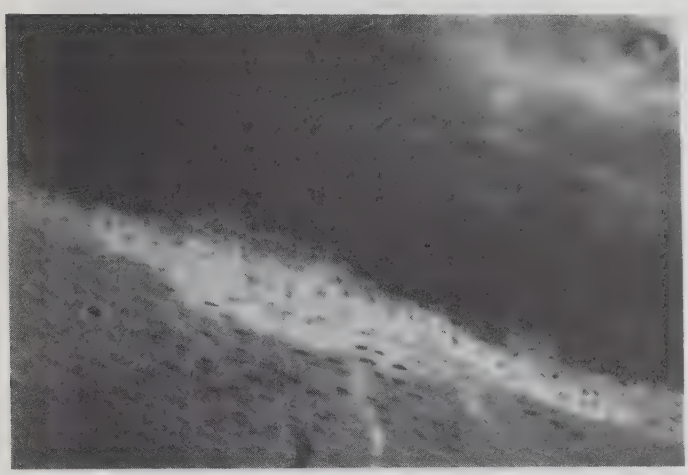

Abb. 25: Subperisotaler Kallus an der Margo superior

Abb. 26: Subperiostaler Kallus an der Margo inferior

Die Bohrlöcher für die Thermoelemente sind nur noch zu erahnen, man kann sie nicht mehr richtig identifizieren. Die perivaskuläre Neubildung ist viel stärker als in den vorigen Präparaten (Abb. 27 und 28).

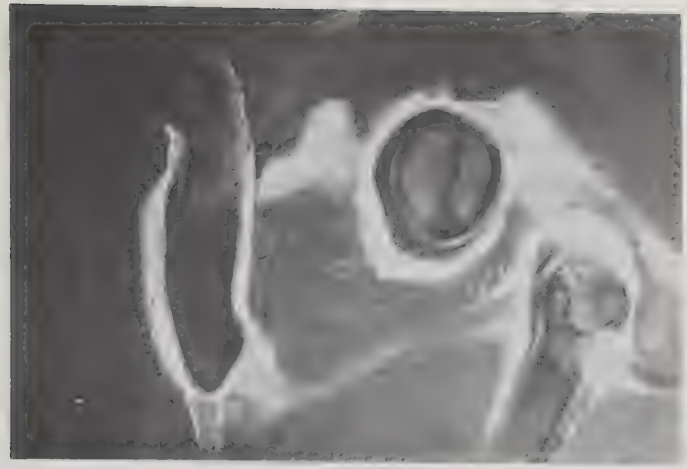

Abb. 27: Polychrome Korticalis

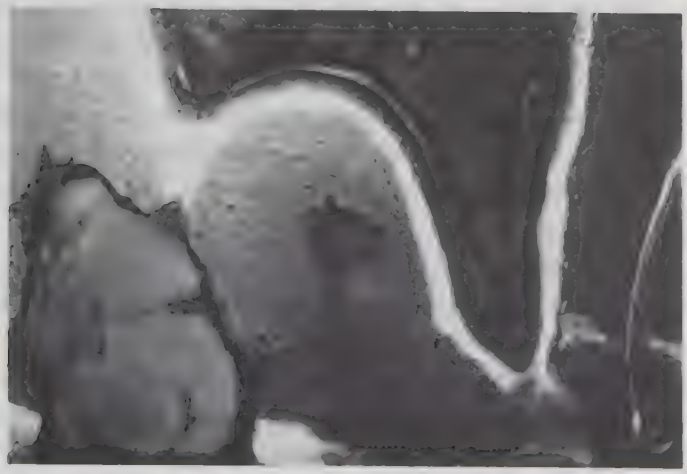

Abb. 28: Knochenapposition perivaskulär

VI. DISKUSSION

Die Kryotherapie gewann als Tumortherapeutikum in den letzten Jahren, vor allem auf dem Gebiet der Kieferchirurgie, an Bedeutung. Entscheidend für ihren wachsenden Stellenwert ist die Entwicklung technisch verbesserter und leicht einsetzbarer Kälteapplikatoren, denn sowohl das Prinzip der Gewebsdevitalisierung durch Kälte als auch das Kühlmittel - flüssiger Stickstoff - war schon lange bekannt.

SCHARGUS entwickelte 1977 eine Kühlschlangenkammer, die an Knochen beliebigen Durchmessers adaptiert werden kann und somit ein Abknicken der Silikonschläuche wie ein EMMINGS Kühlsystem außer Frage stellt. Besonders hervorzuheben bei SCHARGUS' Kälteapplikator ist das Isolierungs- und Heizsystem. Als erster verwendete er ARMAFLEX^{R}, ein Isoliermaterial, das die Erwärmung der Kammer und die Kühlung der Weichteile durch die Kühlkammer verhindert. Es erwies sich dem von EMMINGS angegebenen "rubber sponge", das sich voll Blut und Gewebsflüssigkeit saugte und somit die Isoliereigenschaft verlor, als überlegen.
Um den Schutz der Weichteile zu vervollständigen, benutzte SCHARGUS ein 0,2 mm dünnes Folienheizelement, das zwischen Kühlkammer und Weichteilen plaziert wurde.

Trotz eines anspruchsvollen apparativen Aufwandes konnte die Forschung MAZURs und COOPERs eine Gefriergeschwindigkeit von 100^{o}C pro Minute zu erreichen, nicht erzielt werden. Der gemessene Mittelwert in unseren Versuchen beträgt 35,5^{o}C pro Minute. Da nach MAZUR zur sicheren Devitalisierung eine Geschwindigkeit von mindestens 10^{o}C pro Minute benötigt wird, wurde mit dem Temperaturabfall von 35.5^{o}C pro Minute dieser Forderung genüge getan.

Um eine Zelle sicher zu devitalisieren, muß eine Mindesttemperatur von -20°C bei genügender Gefriergeschwindigkeit erreicht werden (WOOD, ROSENBERG), um den Rektristallisationseffekt auszunützen, sollten -50°C erreicht werden. Tritt bei dieser Temperatur der Zelltod nicht ein, kann auch eine weitere Temperaturerniedrigung die Zelle nicht devitalisieren (LOVELOCK, MAZUR).

Die im Versuch, nach 20 Minuten erreichte Tiefsttemperatur betrug in der Kammermitte -193°C, am proximalen und am distalen Kammerrand -178°C.

Mit der von uns erzielten Gefriergeschwindigkeit von 35,5°C/min und der Tiefsttemperatur von -193°C konnte mit der Kühlschlangenkammer eine sichere Zellzerstörung histologisch nachgewiesen werden (SCHARGUS).

Bei EMMINGS, der das Periost mitgefroren hat, war der abgetötete Knochen schon nach 6 Monaten fast vollständig durch neues Os ersetzt worden. Die Knochenneubildung erfolgte am deperiostierten Unterkiefer anfangs perivaskulär aber schon nach 2 Monaten konnte ein Einsprießen von neuen Gefäßen aus dem gesunden Knochen in das tote Os beobachtet werden. Am Alveolarkamm, wo das Periost belassen wurde, kann man nach 6 Monaten eine Knochenneubildung erkennen. An der Margo inferior ist erst im 8. Monat ein schmaler Knochensaum zu bemerken, was auf eine späte Periostneubildung schließen läßt. Nach 8 Monaten konnte eine etwa 50%ige Knochenregeneration beobachtet werden. Die Reossifikation erfolgte langsamer als bei EMMINGS und setzt erst dann verstärkt ein, wenn das Periost regeneriert ist. Die Unterkiefer der Beaglehunde blieben klinisch fest und funktionsfähig.

Hiermit ist eindeutig der Beweis erbracht, daß der devitalisierte Knochen, auch wenn er seines Periostes, das durch einen Tumor befallen ist, beraubt wurde, durch Weichteilbedeckung sicher revitalisiert. Die zeitliche Verlängerung dieses Vorganges ist deutlich aber verständlich, wenn anfangs die starke periostale Regeneration ausbleibt und nur die langsamere perivaskuläre Knochenneubildung stattfindet.

Hier stellt sich natürlich die Frage ob es wirklich notwendig ist, das Periost mitzuentfernen, selbst wenn es tumorbefallen ist. Läßt es sich von dem Tumor isolieren, so werden die in ihm abgesiedelten Tumorzellen mit Sicherheit genau wie die Osteozyten des gekühlten Knochens devitalisiert.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, die ossären Revitalisationsvorgänge an gekühlten, deperiostierten Hundeunterkiefern zu untersuchen. Um das Prinzip der Kryochirurgie darzustellen, wurden die fünf Faktoren, die für die letale Wirkung der Kälte auf Zellen entscheidend sind, beschrieben.

Die direkte und die indirekte Kühlung, die erreichbaren Tiefsttemperaturen, die Gefriergeschwindigkeit, sowie die Geschwindigkeit des Auftauens wurden besprochen. Besonders wurde die Kühlschlangenkammer in Zusammenhang mit der Angriffsfläche und der Tiefenwirkung hervorgehoben. Weiterhin wurde die Bedeutung der Dauer und der Häufigkeit der Kälteeinwirkung erwähnt.

Im experimentellen Teil wurden nach der Beschreibung des von SCHARGUS 1977 entwickelten Kühlsystems, sowie der Meßanordnung, die Vorteile einer extraoralen Freilegung des Unterkiefers betont. Das Problem der Weichteilisolierung, das SCHARGUS als erster mit einem Folienheizelement und Armaflexschutz löste, wurde dargelegt.

Sowohl die De- wie auch die Revitalisierung wurden trotz einer Gefriergeschwindigkeit von nur 35,5 °C pro Minute histologisch und röntgenologisch eindeutig bewiesen. Zur Markierung des zeitlichen Knochenaufbaus wurden Fluorochrome verwendet und 60 - 80 µ dicke Hartschnittpräparate angefertigt, die eine fachgerechte Betrachtung erlaubten.

Die Frage der Periostbelassung bei der Kryotherapie wurde in den Raum gestellt, weil die Regenerationsvorgänge unserer deperiostierten Kiefer langsamer erfolgten, als bei EMMING's Versuchen, der das Periost mitgefroren hatte.
Eine eindeutige Antwort bedarf noch einer Reihe von vergleichenden Langzeitversuchen.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ANDERSEN, A.C. — The Beagle as an experimental dog

ARNOTT, J. — On the remedial local application of heat and cold. Lancet 2, 439 (1841)

BENNET, J.H. — On cancerous and cancroid growth. Sutherland and Knox, Edinburgh (1849)

BOYLE, R. — New thermometrical experiments and thoughts. Zit. nach Parkes

CAILLETET PICTET — Nouvel appareil pour la liquefaction des gaz. Emploi des gaz liquefies pour la production des basses temperatures. Ann. de Chim. et de Phys. 5, 153 (1883)

CLAUSEN, C.F. SCHMIDT, F. — Untersuchung zur Kryochirurgie. I. Mitteilung: Messung des Temperaturverhaltens zwischen Kälteapplikation und Gewebe. Laryng. Rhinol. 47, 923 (1968)

COOPER, J.S. LEE, A.S. — Cryostatic congelation: A system for producing a limited controlled region of cooling or freezing of biological tissues. J. Nerv and Mental Disorders 133, 259 (1961)

COOPER, J.S.
System to Cryosurgery
Cryobiology 9, 508 (1972)

COOPER, J.S.
The present status of cryogenic surgery.
In: Latest Developments in Cryosurgery.
Hrsg.: Haschek
Wiener Medizinische Akademie, Wien
(1972)

EMMINGS, F.G.
NEIDERS, M.E.
GREENE, G.W.
KOEPF, S.W.
GAGE, A.A.
Freezing the mandible without
excision.
J. oral Surg. 25, 320 (1966)

FAY, T.B.S.
HENNY, G.G.
Symposion on cancer.
Surg. Gyn. & Obstetr. 66, 512 (1938)

GAGE, A.A.
GREENE, G.W.
NEIDERS, M.E.
Freezing bone without excision.
An experimental study of bone cell
destruction and regrowth.
J.A.M.A. 192, 558 (1965)

GERLACH, J.
PESCHEL, G.
PFEIFFER, G.
Untersuchungen zur Gewebehaftung
in der Kryochirurgie.
Z. ges. exp. Med. 12, 175 (1969)

HAUSAMEN, J.E.
Tierexperimentelle Untersuchungen
zur Knochenendestruktion und Regene-
ration am Kaninchenkiefer nach kryochi-
rurgischer Behandlung.
Dtsch. zahnärztl. Z. 28, 836 (1973)

HAUSAMEN, J.E. Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Kryochirurgie im Kiefer- und Gesichtsbereich. Die Quintessenz, Berlin (1974)

KEE, C.E. Liquid nitrogen cryotherapy. Arch. Derm. 96, 198 (1967)

LENZ, H.
PREUSSLER, H. Wirkung des Kryoeffektes auf den wachsenden Knochen. Laryng. Rhinol. 54, 317 (1975)

LOVELOCK, J.E. The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing. Biochem. biophys. Acta 10, 414 (1953)

LOVELOCK, J.E. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. Proc. R. Soc. Med. 47, 60 (1954)

MARCOVE, R.C.
MILLER, T.R.
CAHAN, W.C. Treatment of bone tumors by freezing. Bull. N.Y. Acad. Med. 44, 532 (1968)

MAZUR, P. Physical factors implicated in the death of microorganisms at subzero temperatures. Ann. N.Y. Acad. Sci. 85, 610 (1960)

MAZUR, P. Manifestations of injury in yeast cells exposed to subzero temperatures. I. Morphological changes in freezing-substituted and in "frozen thawed" cells. J. Bact. 82, 662 (1961)

MAZUR, P.
Causes of injury in frozen and thawed cells.
Fed. Proc. 24, 175 (1965)

MAZUR, P.
Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells.
Cryobiology 2, 181 (1966)

MERYMAN, H.T.
Mechanics of freezing in living cells and tissues.
Science 124, 515 (1956)

MERYMAN, H.T.
Physical limitations of the rapid freezing methods.
Proc. Roy. Soc. B. 147, 452 (1957)

OPENCHOWSKI, P.
Sur l'action localisée du froid, appliqué a la surface de la région cortical du cerveau.
C. R. Soc. Biol. 35, 38 (1883)

ROWBOTHAM, G.F.
HAIGH, A.L.
LESLIE, W.G.
Cooling cannula for use treatment of cerebral neoplasma.
Lancet 1, 12 (1959)

SCHARGUS, G.
WINCKLER, J.
SCHRÖDER, F.
SCHÄFER, B.
Cryosurgical devitalisation of bone and its regeneration.
J. max. fac. Surg. 2, 128 (1975)

SCHARGUS, G. Kryochirurgische Devitalisierung des Schweineunterkiefers durch ein variables Kühlsystem. Dtsch. Z. Mund-Kiefer-Gesichts-Chir. 1, 145 (1977)

SCHROTT, K.M.
SIGEL, A. Untersuchungen über die Gefriergeschwindigkeit des neuen Kältedüsensystems. Urologe 9, 295 (1970)

WALLISER, A. Technik der Kryochirurgie am Knochen. Inaugural Dissertation Basel (1972) (Med. Diss. 274)

WHITE, A.C. Liquid air in medicine and surgery. Med. Rec. N.Y. 56, 109 (1899)

WILD, D.E. Cryosurgery: Historical aspect. Minerva Medica 65, 3722 (1974)

WOOD, T.H.
ROSENBERG, A.M. Freezing in yeast cell. Biochem. Biophys. Acta 25, 78 (1957)

ZACARIAN, S.A. Cryosurgery in dermatology. Int. Surg. 47, 528 (1967)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G.Schargus für die Überlassung des Themas sowie für die Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung während der Anfertigung der Arbeit.

Für die Übernahme des Korreferates danke ich Herrn Prof. Dr. R. Naujoks.

Frau Gerber und Herrn Hess darf ich für die geleistete Hilfe während der praktischen Versuche danken.

LEBENSLAUF

16.12.1955	geboren in Arad, Rumänien als zweites Kind des Desiderius Scherer und seiner Ehefrau Liselotte, geborene Unterweger
1962 - 1966	Besuch der Grundschule in Arad
1966 - 1973	Besuch des Gymnasiums in Arad
Juli 1973	Aussiedlung in die Bundesrepublik Deutschland
1973 - 1974	Sonderlehrgang für Spätaussiedler am Wirsberg-Gymnasium in Würzburg
Juni 1974	Abitur in Würzburg
WS 1974	Beginn mit dem Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
WS 1979	Staatsexamen
Febr. 1980 - März 1982	Assistentenstelle bei Dr. Klaus Basel
April 1982	Eröffnung der Zahnarztpraxis in Schweinfurt

Gerd Scherer